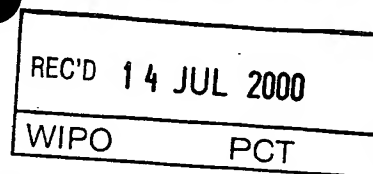


**PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

FR00/1594

**BREVET D'INVENTION**

4

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 11 AVR. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLESIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**BLANK PAGE**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales.

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **11 JUIN 1999**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9907449**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS B**  
DATE DE DÉPÔT **11 JUIN 1999**

1 **NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

**AVENTIS PHARMA SA**  
**Direction Brevets**  
**20 avenue Raymond Aron**  
**92165 ANTONY CEDEX**

n° du pouvoir permanent **07/08/1997** références du correspondant **ST99019** téléphone **0155717036**

2 **DEMANDE** Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande  
de brevet européen

☒ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☒ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**ADENOVIRUS RECOMBINANTS CODANT POUR LE TRANSPORTEUR SPECIFIQUE DE L'IODE  
(NIS).**

3 **DEMANDEUR (S)** n° SIREN **3 0 4 4 6 3 2 8 4** code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

**AVENTIS PHARMA SA**  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**  
**INSTITUT GUSTAVE ROUSSY**

Forme juridique

**S. A.**

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

**20 avenue Raymond Aron - 92160 ANTONY**

**3 rue Michel Ange - 75016 PARIS**

**39 rue Camille Desmoulins - 94800 VILLEJUIF**

Pays

**FRANCE**

**FRANCE**

**FRANCE**

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 **INVENTEUR (S)** Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 **RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES**

☐ requise pour la 1ère fois

☒

requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 **DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE**

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 **DIVISIONS** antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 **SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**  
(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

**DERNONCOUR Roxane**

# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
7, 17				31/1/2000	
28, 29			X	"	

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

BEST AVAILABLE COPY

La présente invention concerne le domaine de la thérapie génique et le traitement des tumeurs. L'invention concerne plus particulièrement l'introduction d'un gène codant pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS dans des cellules tumorales au moyen d'un vecteur adénoviral pour favoriser l'accumulation d'iode dans ces cellules. L'invention concerne également les adénovirus recombinants défectifs pour la réplication comprenant le gène *nis* et l'utilisation de ces vecteurs dans une méthode de traitement des cancers associant le transfert du gène *nis* dans des cellules tumorales et la radiothérapie métabolique par l'iode 131.

L'iode 131 est utilisé depuis plus de cinquante ans dans le traitement des cancers différenciés de la thyroïde. Son efficacité thérapeutique est liée à la dose de radiations délivrée au tissu tumoral. Par exemple dans le cas de métastases, une réponse tumorale après traitement par l'iode 131 est observée lorsque la dose délivrée au niveau du tissu tumoral est supérieure à 80 grays alors que le taux de réponse tumorale est faible ou nul pour des doses inférieures à 35 grays [Maxon, NEJM, 309 : 937-941, 1983]. On peut généralement estimer que les doses totales nécessaires pour traiter ou réduire le volume d'une tumeur varient entre 40 et 60 grays en fonction de leur radiosensibilité. Cette dose totale peut être délivrée lors de plusieurs traitement par l'iode 131, comme cela est réalisé lors du traitement des métastases fixantes de cancer thyroïdien différencié.

La dose de radiation délivrée au tissu tumoral dépend de deux facteurs biologiques : la demi-vie effective ( $T_{\text{eff}}$ ) de l'iode 131 dans le tissu tumoral et la concentration radioactive.

- La demi-vie effective ( $T_{\text{eff}}$ ) de l'iode 131 dans le tissu tumoral dépend de la demi-vie biologique ( $T_{\text{biol}}$ ) et de la demi-vie physique ( $T_{\text{phys}}$ ) selon la relation  $1/T_{\text{eff}} = 1/T_{\text{biol}} + 1/T_{\text{phys}}$ . La demi-vie biologique ( $T_{\text{biol}}$ ) de l'iode 131 dans les cellules fixantes dépend de leur capacité d'organification de l'iode. En l'absence d'organification, comme par exemple dans les cellules non thyroïdiennes, la demi-vie biologique est brève, de quelques heures à quelques dizaines d'heures. La demi-vie physique ( $T_{\text{phys}}$ ) de l'iode 131 est de 8.02 jours. Ainsi, au mieux, on peut estimer que la demi-vie effective de l'iode 131 dans un tissu tumoral est de quelques heures à quelques dizaines d'heures.

ORIGINAL

- La concentration radioactive est le rapport entre la fixation globale de l'iode 131 par le tissu tumoral et la masse de ce tissu.

A titre d'exemple, pour une fixation d'iode de 0.1 % de l'activité administrée pour 1 g de tissu et une demie-vie effective de 1.5 jours, on peut estimer que  
5 l'administration de 3,7 gigabecquerel (ou 100 mCi) délivre une dose de 30 grays au tissu tumoral.

La fixation globale d'iode 131 est un paramètre qui dépend d'une part, de l'activité de l'iode 131 administrée au patient et d'autre part, des capacités du tissu tumoral à concentrer l'iode 131.

10 - L'activité maximale d'iode 131 pouvant être administrée à un patient est limitée par la toxicité de l'iode de l'iode 131 résultant des doses d'irradiation délivrées aux tissus sains et notamment à la moelle osseuse. Ainsi en cas de cancer de la thyroïde, les activités thérapeutiques administrées, alors que les patients sont en état d'hypothyroïdie, sont en général comprises entre 3.7 et 10 GBq (100 à 300 mCi). Les  
15 activités maximales pouvant être administrées à des patients euthyroïdiens sont plus élevées car la rétention de l'iode est alors deux fois inférieure à celle observée en cas d'hypothyroïdie, elles atteignent des valeurs comprises entre 8,5 et 22.2 GBq (500 à 600 mCi).

- La capacité du tissu tumoral à concentrer l'iode 131, pour une activité  
20 déterminée administrée au patient, dépend du niveau d'expression du symporteur de l'iode et de son activité biologique. Ceci a été démontré par l'étude des tissus thyroïdiens humains normaux et pathologiques et par des études *in vitro* de l'activité du NIS. L'activité spécifique de l'iode 131 étant élevée, il n'a pas été observé de phénomène de saturation avec augmentation de l'activité d'iode 131 administrée.

25 En raison de la limitation de l'activité maximale d'iode 131 pouvant être administrée au patient, il serait souhaitable de pouvoir accroître la capacité du tissu tumoral à concentrer l'iode 131 pour augmenter la fixation globale de l'iode 131.

Il est également déterminant que l'augmentation de la fixation de l'iode se fasse de manière homogène au niveau du tissu tumoral. En effet, la fixation de l'iode dans  
30 un tissu fixant peut être très hétérogène d'une cellule à l'autre, voire d'une zone

tumorale à une autre. La dose d'irradiation au niveau du tissu tumoral est délivrée essentiellement par l'émission  $\beta$  de l'iode 131. Or son parcours dans les tissus biologiques est au maximum de 2 à 3 mm. De plus, autour d'une source ponctuelle, la dose d'irradiation diminue de manière exponentielle avec la distance. Ces éléments  
 5 renforcent l'importance d'atteindre une forte concentration radioactive au niveau des zones tumorales fixantes et d'autre part, la nécessité d'obtenir une fixation d'iode aussi homogène que possible.

Il faut noter que la fixation de l'iode 131 par la thyroïde humaine, et donc son irradiation, peut être facilement supprimée (fixation d'iode 131 non mesurable) par  
 10 l'administration de L-triiodothyronine 1  $\mu\text{g/kg/jour}$  divisée en trois prises quotidiennes pendant trois semaines.

Le transporteur NIS est responsable de la concentration de l'iode circulant (sous forme d'iodure I<sup>-</sup>) par les thyrocytes [pour une revue voir P. Thomopoulos, Médecine et Science, vol 4(10), p. 825-828]. La concentration de l'iode dans ces  
 15 cellules présente les caractéristiques suivantes : l'iode est concentré d'un facteur 30 à 40 fois contre un gradient électrochimique ; il requiert la présence de sodium (Na<sup>+</sup>) ; il s'agit d'un transport actif, il est inhibé de manière compétitive par certains anions, tels le thiocyanate, le perchlorate, le pertechnétate. La concentration de l'iode par les thyrocytes est suivi de l'organification de l'iode et la synthèse d'iodotyrosines et  
 20 d'hormones thyroïdiennes (thyroxine T4 et triiodothyronine T3).

Les gènes codant pour le transporteur murin [Dai et al. Nature 379 : 458 - 460 (1996)] et le transporteur humain [Smanik P.A. *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 226 : 339 - 345 (1996)] de l'iode NIS ont été isolés, ils sont identiques à 84 %. Le gène est localisé sur le chromosome 19p dans l'espèce humaine. Il comporte 15  
 25 exons séparés par 14 introns. Sa transcription donne naissance à deux formes par épissage alternatif, dont la forme longue prédomine dans la thyroïde. La protéine a un poids moléculaire de 55 kDa, atteignant 80 kDa après glycosylation. Elle est localisée dans la membrane latérobasale des thyrocytes. Ses extrémités aminoterminal et carboxyterminale sont intracellulaires tandis que le reste de la chaîne peptidique  
 30 comporte 13 segments transmembranaires réunis par des boucles intracellulaires et extracellulaires [Levy *et al.*, 1998, J. Biol. Chem. 273 : 22657-22663]. L'introduction du gène codant pour NIS dans des cellules non thyroïdiennes leur confère la capacité à

capter l'iode, avec les mêmes propriétés que les thyrocytes, en particulier la présence obligatoire de sodium ( $\text{Na}^+$ ) et l'inhibition par les anions perchlorates.

La transcription du gène *nis* est activée dans les thyrocytes par la TSH. Cet effet est médié par l'AMP cyclique. La demi-vie de la protéine, dans les thyrocytes murins est de 4 jours [Paire A. et al. J. Biol. Chem. 272 : 18245 - 18249 (1997)]. Dans les tissus extrathyroïdiens, l'activité du gène est plus faible que celle de la thyroïde à l'état basal. Ceci est vraisemblablement dû à la stimulation de la transcription du gène *nis* dans les thyrocytes, par le facteur spécifique de transcription TTF-1 (thyroid transcription factor 1), qui peut se lier au promoteur du gène *nis* thyroïdien, mais non à celui des autres tissus [Endo T. et al. Mol. Endocrinol. 11 : 1747 - 1755 (1997)]. En dehors de la thyroïde, certains tissus sont capables de capter et de concentrer l'iode notamment les glandes salivaires et la muqueuse gastrique.

Une étude récente rapporte le transfert du gène *nis* au moyen d'un vecteur rétroviral dans des cellules tumorales humaines ou murines [Mandell et al. Cancer Research 59 : 661-668 (1999)]. Ces résultats sont intéressants en ce qu'ils montrent qu'il est possible d'exprimer le gène *nis* dans des cellules non thyroïdiennes et d'observer une concentration de l'iode dans des cellules qui n'accumulent pas cet élément naturellement. Cependant un certain nombre de facteurs limitants restent à surmonter afin d'atteindre un niveau de fixation de l'iode suffisant pour envisager une application thérapeutique.

Un premier facteur est le faible niveau d'expression du gène *nis* au niveau des cellules tumorales. Par exemple, dans l'étude précitée, les résultats obtenus *in vitro* montrent que la concentration d'iode atteinte dans les cellules tumorales non thyroïdiennes reste environ deux fois inférieure à la concentration d'iode accumulée dans les cellules thyroïdiennes.

De plus, compte tenu des perturbations importantes que présentent les cellules tumorales au niveau membranaire, il apparaît difficile d'assurer l'intégration fonctionnelle d'un transporteur avec une efficacité comparable à celle des cellules thyroïdiennes non tumorales.



Un autre facteur limitant est l'absence d'organification de l'iode au niveau des cellules non thyroïdiennes, or cette organification de l'iode est un élément nécessaire au maintien de l'iode dans les cellules. Ainsi dans l'étude rapportée ci-dessus, il est observé un efflux très rapide de l'iode accumulé *in vitro* (entre 30 et 60 min) pour les

5 cellules non thyroïdiennes.

Enfin compte tenu de l'hétérogénéité des cellules tumorales et des modifications importantes de ces cellules au niveau membranaire, il semble difficile de pouvoir atteindre une répartition homogène du transporteur NIS au niveau des membranes des cellules tumorales.

10 Ainsi aucune approche décrite à ce jour n'a encore permis d'atteindre une accumulation de l'iode au niveau de tumeur non thyroïdienne avec un niveau d'expression suffisant pour envisager l'utilisation de l'iode 131 pour le traitement des tumeurs non thyroïdiennes.

La présente invention présente une méthode améliorée de traitement des

15 tumeurs combinant la thérapie génique et la radiothérapie à l'iode 131

La présente invention décrit en particulier une méthode permettant d'augmenter l'efficacité de la fixation de l'iode au niveau des tumeurs non thyroïdiennes et permettant ainsi d'appliquer aux tumeurs non thyroïdiennes, les principes de radiothérapie développés avec succès pour le traitement des cancers

20 thyroïdiens.

La présente invention résulte de la mise en évidence que le transfert du gène codant pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS au moyen d'un adénovirus recombinant défectif permet d'atteindre une accumulation d'iode très importante au niveau de cellules tumorales non thyroïdiennes. Dans un mode de réalisation spécifique, l'apport d'un adénovirus défectif exprimant le gène *nis* permet

25 d'accumuler l'iode à des concentrations environ cinq fois supérieures à celles observées dans les cellules thyroïdiennes. Cette capacité surprenante des cellules tumorales non thyroïdiennes à accumuler l'iode 125 permet d'envisager pour ce type de tumeurs une nouvelle approche thérapeutique basée sur la radiothérapie

métabolique par l'iode 131 ; approche jusqu'alors réservée au traitement de certaines tumeurs thyroïdiennes.

5 L'intérêt majeur de la radiothérapie métabolique est de délivrer des doses d'irradiation importantes aux tissus fixants l'isotope radioactif, sans irradier significativement les tissus environnants.

10 La découverte qu'il est effectivement possible de concentrer de manière importante l'iode dans des cellules tumorales qui sont normalement incapables d'accumuler cet élément permet d'envisager l'application de cette méthode notamment dans deux types d'indications : les tumeurs difficilement accessibles à la radiothérapie externe en raison de leur localisation, à titre d'exemple on peut citer les cancers de la prostate inopérables ou les tumeurs intracérébrales ; les tumeurs ayant déjà été irradiées et pour lesquelles un complément de radiothérapie externe est impossible, car les doses maximales ont déjà été délivrées : ceci concerne tous les cancers survenant ou rechutant en zones irradiées.

15 Il est également envisageable de combiner la radiothérapie métabolique et la radiothérapie externe comme cela est réalisé en cas de métastases de cancer différencié de la thyroïde. Cette combinaison permet d'augmenter l'efficacité thérapeutique de la radiothérapie, sans en augmenter la toxicité. Cette combinaison paraît particulièrement intéressante pour les tumeurs peu sensibles à la radiothérapie. Par ailleurs, elle permet  
20 d'envisager l'application de cette technique à des tumeurs qui ne seraient pas accessibles à la radiothérapie métabolique seule, en raison de leur taille trop importante.

25 Un premier objet de l'invention réside donc dans un adénovirus recombinant défectif comprenant au moins une séquence d'ADN hétérologue codant pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS, ou un de ses dérivés.

30 Au sens de la présente invention on entend par "dérivé" du transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS tout analogue, fragment ou forme mutée qui est dérivé du polypeptide NIS et qui conserve une activité de transport spécifique de l'iode. Différents dérivés peuvent exister à l'état naturel. Ces dérivés peuvent être des variations alléliques caractérisées par des différences dans la séquence

nucléotidique des gènes de structure codant pour le NIS ou peuvent résulter d'un épissage différentiel ou de modifications post-traductionnelle. Ces dérivés peuvent être obtenus par substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus acides aminés. Ces modifications peuvent être réalisées par toutes techniques connues de l'homme du métier. Ces dérivés sont notamment des molécules ayant une plus grande affinité pour leurs substrats, des séquences permettant une expression améliorée *in vivo*, des molécules présentant une plus grande résistance aux protéases, des molécules ayant une efficacité biologique plus grande ou des effets secondaires moindres, ou éventuellement de nouvelles propriétés biologiques. D'autres dérivés utilisables dans le cadre de l'invention sont notamment les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, les dérivés obtenus par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés ou exprimant une activité indésirable, et les dérivés comportant par rapport à la séquence native des résidus supplémentaires, tels que par exemple un signal de sécrétion et/ou un peptide de jonction.

Le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS ou son dérivé, produit dans le cadre de la présente invention peut être un ADNc, un ADN génomique (ADNg), ou une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. De manière avantageuse, on utilise un ADNc ou un ADNg. En particulier, l'utilisation d'un ADNg peut permettre une meilleure expression dans les cellules humaines.

Selon un mode préféré de l'invention, il s'agit d'une séquence d'ADNc codant pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS d'origine humaine.

Les adénovirus utilisés dans le cadre de la présente invention sont des adénovirus recombinants, c'est à dire comprenant une séquence d'ADN hétérologue. Avantageusement, il s'agit d'adénovirus recombinant défectifs, c'est à dire incapable de répllication autonome dans les cellules cibles.

Pour la construction des adénovirus selon l'invention, différents sérotypes peuvent être utilisés. Il existe en effet de nombreux sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui présentent une organisation génétique

comparable. Plus particulièrement, les adénovirus recombinants peuvent être d'origine humaine ou animale. Concernant les adénovirus d'origine humaine, on peut citer préférentiellement ceux classés dans le groupe C, en particulier les adénovirus de type 2 (Ad2), 5 (Ad5), 7 (Ad7) ou 12 (Ad12). Parmi les différents adénovirus d'origine animale, on peut citer préférentiellement les adénovirus d'origine canine, et notamment toutes les souches des adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. D'autres adénovirus d'origine animale sont cités notamment dans la demande WO94/26914 incorporée à la présente par référence.

Le génome des adénovirus comprend notamment une séquence inversée répétée (ITR) à chaque extrémité, une séquence d'encapsidation (Psi), des gènes précoces et des gènes tardifs. Les principaux gènes précoces sont contenus dans les régions E1, E2, E3 et E4. Parmi ceux-ci, les gènes contenus dans la région E1 notamment sont nécessaires à la propagation virale. Les principaux gènes tardifs sont contenus dans les régions L1 à L5. Le génome de l'adénovirus Ad5 a été entièrement séquencé et est accessible sur base de données (voir notamment Genbank M73260). De même des parties, voire la totalité d'autres génomes adénoviraux (Ad2, Ad7, Ad12, etc) ont également été séquencées.

Comme indiqué ci-avant, les adénovirus selon l'invention sont défectifs et sont donc incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. A cet effet, différentes constructions dérivées des adénovirus ont été préparées, incorporant différents gènes thérapeutiques. Dans chacune de ces constructions, l'adénovirus a été modifié de manière à le rendre incapable de répllication dans la cellule infectée. Ainsi, les constructions décrites dans l'art antérieur sont des adénovirus délétés de la région E1, essentielle à la répllication virale, au niveau de laquelle sont insérées les séquences d'ADN hétérologue (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195 ; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161). Par ailleurs, pour améliorer les propriétés du vecteur, il a été proposé de créer d'autres délétions ou modifications dans le génome de l'adénovirus. Ainsi, une mutation ponctuelle thermosensible a été introduite dans le mutant ts125, permettant d'inactiver la protéine de 72kDa de liaison à l'ADN (DBP) (Van der Vliet et al., J. Virol., 1975, 15(2) 348-354). D'autres vecteurs comprennent une délétion d'une autre région essentielle à la répllication et/ou à la propagation virale, la région E4. La région E4 est en effet impliquée dans la régulation de l'expression des gènes

tardifs, dans la stabilité des ARN nucléaires tardifs, dans l'extinction de l'expression des protéines de la cellule hôte et dans l'efficacité de la réplication de l'ADN viral. Des vecteurs adénoviraux dans lesquels les régions E1 et E4 sont délétées possèdent donc un bruit de fond de transcription et une expression de gènes viraux très réduits. De tels vecteurs ont été décrits pas exemple dans les demandes WO94/28152, WO95/02697, WO96/22378. En outre, des vecteurs portant une modification au niveau du gène IVa2 ont également été décrits (WO96/10088).

Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, l'adénovirus recombinant est un adénovirus humain du groupe C. De manière plus préférentielle, il s'agit d'un adénovirus Ad2 ou Ad5.

Avantageusement, l'adénovirus recombinant utilisé dans le cadre de l'invention comprend une délétion dans la région E1 de son génome. Encore plus particulièrement, il comprend une délétion des régions E1a et E1b. A titre d'exemple, on peut citer des délétions affectant les nucléotides 454-3328 , 386-3446 , 459-3510 ou 357-4020 (par référence au génome de l'Ad5).

Selon une autre variante, l'adénovirus recombinant utilisé dans le cadre de l'invention est déficient pour tout ou partie des régions E1 et E3 au moins.

Selon une autre variante, l'adénovirus recombinant utilisé dans le cadre de l'invention comprend outre une délétion dans la région E1, une délétion affectant tout ou partie de la région E4 de son génome. Plus particulièrement, la délétion dans la région E4 affecte l'ensemble des phases ouvertes. On peut citer à titre d'exemple précis les délétions 33466-35535 ou 33093-35535 ou une partie seulement de la région E4 (ORF6 ou ORF3 par exemple), comme décrit dans les demandes WO95/02697 et WO96/22378, incorporées à la présente par référence.

Il peut s'agir par exemple d'adénovirus recombinants dits de 3<sup>ème</sup> génération, c'est à dire déficients pour les régions E1 et E4, en tout ou partie, et éventuellement pour la région E3. Des variantes particulières de l'invention sont constituées par l'utilisation d'adénovirus portant des délétions affectant tout ou une partie des régions fonctionnelles suivantes :

- E1, E4 et E3 ,

- E1, E4 et E2 ,
  - E1, E4, E2 et E3 ,
  - les régions ci-dessus ainsi que tout ou partie des gènes codant pour les fonctions tardives de l'adénovirus (L1 à L5), ou encore,
- 5       - l'ensemble des régions virales codantes.

Concernant les adénovirus dépourvus en plus des fonctions tardives (vecteur "minimum") ou de l'ensemble des régions codantes (vecteur "gutless"), leur construction a été décrite par exemple par Parks et al. PNAS 93 (1996) p. 13565 et Lieber et al., J. Virol. 70 (1996) p. 8944.

- 10       La cassette d'expression contenant l'acide nucléique codant pour le transporteur de l'iode (NIS) peut être insérée en différents sites du génome recombinant. Elle peut être insérée au niveau de la région E1, E3 ou E4, en remplacement des séquences délétées ou en surplus. Elle peut également être insérée en tout autre site, en dehors des séquences nécessaires en cis à la production des virus
- 15       (séquences ITR et séquence d'encapsidation).

- Au sens de la présente invention on entend par "cassette d'expression" d'un acide nucléique, un fragment d'ADN qui peut être inséré dans un vecteur à des sites de restrictions spécifiques ; le fragment d'ADN comprend, outre la séquence nucléotidique codant pour un ARN ou un polypeptide d'intérêt, les séquences
- 20       nécessaires à l'expression (enhanceur(s), promoteur(s), séquence de polyadénylation ...) de ladite séquence d'intérêt. Le fragment d'ADN et les sites de restriction sont conçus pour assurer une insertion dudit fragment dans un cadre de lecture approprié pour la transcription et/ou la traduction.

- Les adénovirus recombinants sont produits dans une lignée d'encapsidation, c'est-à-dire une lignée de cellules capables de compléter en trans une ou plusieurs
- 25       des fonctions déficientes dans le génome adénoviral recombinant. Parmi les lignées d'encapsidation connues par l'homme du métier, on peut citer par exemple la lignée 293 dans laquelle une partie du génome de l'adénovirus a été intégrée. Plus précisément, la lignée 293 est une lignée de cellules embryonnaires humaines de rein

- contenant l'extrémité gauche (environ 11-12 %) du génome de l'adénovirus sérotype 5 (Ad5), comprenant l'ITR gauche, la région d'encapsidation, la région E1, incluant E1a et E1b, la région codant pour la protéine pIX et une partie de la région codant pour la protéine pIVa2. Cette lignée est capable de trans-complémenter des adénovirus recombinants défectifs pour la région E1, c'est-à-dire dépourvus de tout ou partie de la région E1, et de produire des stocks viraux ayant des titres élevés. Cette lignée est également capable de produire, à température permissive (32°C), des stocks de virus comportant en outre la mutation E2 thermosensible. D'autres lignées cellulaires capables de compléter la région E1 ont été décrites, basées notamment sur des cellules de carcinome de poumon humain A549 (WO94/28152) ou sur des rétinoblastes humains (Hum. Gen. Ther. (1996) 215). Par ailleurs, des lignées capables de trans-complémenter plusieurs fonctions de l'adénovirus ont également été décrites. En particulier, on peut citer des lignées complétant les régions E1 et E4 (Yeh et al., J. Virol. Vol. 70 (1996) pp 559-565; Cancer Gen. Ther. 2 (1995) 322 ; Krougliak et al., Hum. Gen. Ther. 6 (1995) 1575) et des lignées complétant les régions E1 et E2 (WO94/28152, WO95/02697, WO95/27071) ou des lignées dérivées de celles-ci utilisables pour produire des adénovirus minimum, en particulier parce qu'elles expriment en outre une activité de recombinaison site spécifique impliquée dans la construction de tels virus.
- Les adénovirus recombinants peuvent également être modifiés dans la structure de la capsid pour augmenter l'efficacité d'infection au niveau de la tumeur. Par exemple la capsid peut contenir un ligand de uPAR ou un motif RGD qui permet le ciblage de l'adénovirus vers les cellules tumorales. Le ligand dérivé de uPAR est avantageusement une séquence choisie parmi les séquences
- LNGGTCVSNKYFSNIHWCN ; LNGGTAVSNKYFSNIHWCN ;  
 AEPMPHSLNFSQYLWT ; RGHSRGRNQNSR et NQNSRRPSRA.

Selon une autre variante, la séquence de ciblage est choisie parmi les séquences suivantes :

- gly-ser-LNGGTCVSNKYFSNIHWCN-gly-ser ;
- gly-ser-LNGGTAVSNKYFSNIHWCN-gly-ser ;
- gly-ser-AEPMPHSLNFSQYLWT-gly-ser ;

gly-ser-RGHSRGRNQNSR-gly-ser ;

gly-ser-NQNSRRPSRA-gly-ser ;

gly-ser-CDCRGDCFC-gly-ser ;

gly-ser-DCRGDCF-gly-ser ; et

5 gly-ser-KKKKKKK-gly-ser.

gly-ser-ser-LNGGTCVSNKYFSNIHWCN-gly-ser-ser ;

gly-ser-ser-LNGGTAVSNKYFSNIHWCN-gly-ser-ser ;

gly-ser-ser-AEPMPSLNFSQYLWT-gly-ser-ser ;

gly-ser-ser-RGHSRGRNQNSR-gly-ser-ser ;

10 gly-ser-ser-NQNSRRPSRA-gly-ser-ser ;

gly-ser-ser-CDCRGDCFC-gly-ser-ser ;

gly-ser-ser-DCRGDCF-gly-ser-ser ; et

gly-ser-ser-KKKKKKK-gly-ser-ser.

15 Les séquences de ciblage peuvent être insérées dans la protéine de l'hexon ou dans la protéine de la fibre. De préférence les séquences de ciblages sont insérées au niveau de délétion de la protéine de la fibre ou de l'hexon. La séquence polypeptidique de l'hexon est avantageusement déléetée de 13 amino acides correspondant aux positions 279 à 292 de la séquence polypeptidique de l'hexon de Ad 5. La séquence

20 polypeptidique de la fibre est avantageusement déléetée de 11 amino acides correspondant aux positions 539 à 547 de la séquence polypeptidique de la fibre (HI Loop) de Ad 5.

Les adénovirus recombinants sont habituellement produits par introduction de l'ADN viral dans la lignée d'encapsidation, suivie d'une lyse des cellules après environ 2

25 ou 3 jours (la cinétique du cycle adénoviral étant de 24 à 36 heures). Pour la mise en oeuvre du procédé, l'ADN viral introduit peut être le génome viral recombinant complet, éventuellement construit dans une bactérie (WO96/25506) ou dans une



levure (WO95/03400), infecté dans les cellules. Il peut également s'agir d'un virus recombinant utilisé pour infecter la lignée d'encapsidation. L'ADN viral peut aussi être introduit sous forme de fragments portant chacun une partie du génome viral recombinant et une zone d'homologie permettant, après introduction dans la cellule  
5 d'encapsidation, de reconstituer le génome viral recombinant par recombinaison homologue entre les différents fragments.

Après la lyse des cellules, les particules virales recombinantes peuvent être isolées par toute technique connue telle que la centrifugation en gradient de chlorure de césium ou la chromatographie. Une méthode alternative a été décrite dans la  
10 demande WO98/00528 incorporée à la présente par référence.

*Séquences de régulation de l'expression.* Le gène codant pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur, NIS) peut être placé sous le contrôle de toute séquence régulatrice de l'expression telle que par exemple un promoteur ou un promoteur /enhancer, fonctionnelle et permettant l'expression dans  
15 les cellules hôtes tumorales.

Les séquences régulatrices de l'expression peuvent comprendre, outre la région promotrice, une région située en 3' du gène codant pour le transporteur spécifique de l'iode et qui fournit un signal de fin de transcription et un site de polyadénylation. L'ensemble de ces éléments constitue une cassette d'expression.

20 Le promoteur peut être constitutif ou régulable (inductible). Il peut s'agir du propre promoteur du gène. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même d'un promoteur synthétique). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la  
25 cellule que l'on désire transfecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris du virus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, MT-1, SV40 etc.

En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, permettant une expression tissu-spécifique ou  
30 prédominante dans certains tissus (promoteur éolase, GFAP, etc.). Il peut en effet

être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules tumorales, de manière à ce que le gène thérapeutique ne soit exprimé et ne produise son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule tumorale. Le caractère spécifique ou majoritaire de l'expression signifie que l'activité du promoteur est significativement très supérieure dans les cellules tumorales. Bien qu'une expression non-spécifique puisse exister dans d'autres cellules, le niveau d'activité correspondant reste généralement très faible (négligeable) par rapport à celui observé dans les cellules tumorales, généralement inférieur d'un facteur 10 au moins.

Parmi les promoteurs utilisables dans le cadre de l'invention on peut citer les promoteurs ubiquitaires (HPRT, vimentine,  $\alpha$ -actine, tubuline, etc.), les promoteurs des filaments intermédiaires (desmine, neurofilaments, kératine, GFAP), les promoteurs de gènes d'intérêt thérapeutique (MDR, CFTR, facteur VIII etc.), les promoteurs spécifiques de tissus (promoteurs des gènes de la desmine, des myosines, de la créatine kinase, de la phosphoglycérate kinase), les promoteurs plus spécifiquement actifs dans les cellules en croissance ou encore les promoteurs répondant à un stimulus tels que des promoteurs répondant aux hormones naturelles (récepteurs des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinoïque, etc.) ou un promoteur régulé par les antibiotiques (tétracycline, rapamycine, etc.) ou d'autres promoteurs répondant à d'autres molécules d'origine naturelle ou synthétique ou de séquences promotrices issues du génome d'un virus comme l'enhancer/promoteur du cytomégalo virus CMV, le promoteur LTR du rétrovirus, le promoteur SV40, le promoteur du gène E1A, le promoteur MLP. Les promoteurs régulables par la tétracycline et le promoteur CMV ont été décrits dans WO96/01313, US 5,168,062 et US 5,385,839 incorporés à la présente par référence.

Parmi les promoteurs utilisables pour la mise en oeuvre de l'invention on peut citer notamment le promoteur du cytomégalo virus (CMV), la région promotrice early du SV40 (Benoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310), le promoteur compris dans la région 3' LTR du virus du sarcome de Rous (Yamamoto, *et al.*, 1980, Cell 22:787-797), le promoteur de la thymidine kinase du virus de l'herpes (Wagner *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445), les séquences régulatrices du gène de la métallothionéine (Brinster *et al.*, 1982, Nature 296:39-42); les promoteurs

d'origine procaryotes comme le promoteur de la  $\beta$ -lactamase (Villa-Kamaroff, *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731), ou le promoteur *tac* (DeBoer, *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25); voir également "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242:74-94; les promoteurs

5 de levures tels que les promoteurs Gal4, ADC (alcool déshydrogénase), PGK (phosphoglycérol kinase), phosphatase alcaline ; et les séquences de régulation transcriptionnelle d'origine animale qui présentent une spécificité de tissus et qui sont utilisés pour les animaux transgéniques : les séquences de régulation du gène de l'élastase I qui sont actives dans les cellules des acini du pancréas (Swift, 1984, Cell

10 38:639-646; Ornitz *et al.*, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515) ; les séquences de régulation du gène l'insuline qui sont actives dans les cellules beta du pancréas (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122), les séquences de régulation de l'expression des immunoglobulines qui sont actives dans les cellules lymphoïdes (Grosschedl *et al.*, 1984, Cell 38:647-658;

15 Adames *et al.*, 1985, Nature 318:533-538; Alexander *et al.*, 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444), la séquence de régulation du virus des tumeurs mammaires de souris qui est active dans les cellules des testicules, du sein, les lymphocytes et les mastocytes (Leder *et al.*, 1986, Cell 45:485-495), la séquence de régulation du gène PSA qui est active dans les tumeurs prostatiques, la séquence de régulation du gène de l'albumine

20 qui est active dans le foie (Pinkert *et al.*, 1987, Genes and Devel. 1:268-276), la séquence de régulation du gène de l'alpha-foetoprotéine qui est active dans le foie (Krumlauf *et al.*, 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer *et al.*, 1987, Science 235:53-58), la séquence de régulation du gène de l'alpha 1-antitrypsine qui est active dans le foie (Kelsey *et al.*, 1987, Genes and Devel. 1:161-171), ), la séquence de

25 régulation du gène de la  $\beta$ -globine qui est active dans les cellules myéloïdes (Mogam *et al.*, 1985, Nature 315:338-340; Kollias *et al.*, 1986, Cell 46:89-94), la séquence de régulation du gène de la myéline basique qui est active dans les oligodendrocytes dans le cerveau (Readhead *et al.*, 1987, Cell 48:703-712), ), la séquence de régulation du gène de la chaîne légère 2 de la myosine qui est active dans le muscle squelettique

30 (Sani, 1985, Nature 314:283-286), et la séquence de régulation du gène de l'hormone de libération des gonadotrophines qui est active au niveau de l'hypothalamus (Mason *et al.*, 1986, Science 234:1372-1378).

Dans un mode particulier de réalisation de l'invention, on utilise un adénovirus recombinant défectif comprenant un gène codant pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS sous le contrôle d'un promoteur viral, choisi de préférence parmi le LTR-RSV ou le promoteur précoce du CMV.

5 Il est également possible d'associer l'introduction du gène NIS avec le vecteur selon l'invention à l'introduction d'un système biologique permettant l'augmentation de la demi-vie biologique de l'iode 131 (système d'organification de l'iode tel que par exemple l'introduction d'un système peroxydasique dans les cellules tumorales :  
10 glucose oxydase). Ce système peut être administré en utilisant le même vecteur ou un vecteur séparé.

Il est en outre possible d'associer l'introduction du gène NIS avec le vecteur selon l'invention à l'administration d'un système permettant un ralentissement de l'efflux de l'iode par un agent pharmacologique (par exemple, un sel de lithium).

15 Selon une autre variante, il est également envisageable d'associer l'introduction du gène NIS avec d'autres gènes d'intérêt thérapeutique pour le traitement des cancers. Il peut s'agir d'un gène suicide tel que le gène de la thymidine kinase de l'Herpès ou le gène de la cytosine déaminase. Il peut s'agir de gènes codant pour des protéines induisant l'apoptose comme p53, Bax, BclX-s, Bad ou tout autre antagoniste de Bcl2 et de BclX-1. Il peut s'agir de gènes codant pour des variants de  
20 ces protéines présentant des propriétés améliorées comme un variant de p53 (CTS-1, WO97/04092). Il peut s'agir également de gènes codant pour des facteurs angiogéniques tels que notamment le ligand de Tie-1 et de Tie-2, l'angiostatine, l'endostatine, le facteur ATF, les dérivés du plasminogène, l'endothéline, les thrombospondines 1 et 2, le PF-4, l'interféron  $\alpha$  ou  $\beta$ , l'interleukine 12, le  $\text{TNF}\alpha$ , le  
25 récepteur de l'urokinase, flt1, KDR, PAI1, PAI2, TIMP1, le fragment prolactine. Il peut s'agir également de gènes codant pour des protéines capables d'induire une immunité antitumorale ou stimuler la réponse immunitaire (IL2, GM-CSF, IL12, etc.). Parmi les gènes codant pour des protéines d'intérêt thérapeutique dans le traitement des cancers, il est également important de souligner les anticorps, les fragments  
30 variables d'anticorps simple chaîne (ScFv) ou tout autre fragment d'anticorps possédant des capacités de reconnaissance pour une utilisation en immunothérapie pour le traitement des tumeurs : anticorps anti-RAS (WO9429446).

De manière avantageuse, il peut s'agir d'un gène dont l'expression entraîne une radiosensibilisation des cellules tumorale comme le gène p53.

5 L'administration de ces gènes ou de la combinaison de deux ou plusieurs de ces gènes d'intérêt thérapeutique précités peut être réalisée par introduction d'un ou plusieurs de ces gènes dans le vecteur adénoviral comprenant le gène codant pour le transporteur NIS ou dans un vecteur séparé de nature virale ou non virale.

10 Selon une autre variante, le vecteur selon l'invention peut être administré en combinaison avec un agent anticancéreux tel que notamment, le taxol, le taxotère et autre taxoïdes [tels que décrits notamment dans U.S. 4,857,653 ; US 4,814,470 ; US 4,924,011 ; US 5,290,957 ; US 5,292,921 ; US 5,438,072 ; US 5,587,493 ; EP 0 253 738 ; et WO91/17976 , WO93/00928 , WO93/00929 , et WO9601815], ou d'autres agents thérapeutiques anticancéreux tels que le cis-platine et les dérivés du platine, l'étoposide and etoposide phosphate, bléomycine, mitomycine C, CCNU, doxorubicine, daunorubicine, idarubicine, ifosfamide, etc.

15 L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un vecteur adénoviral tel que décrit ci-avant et un véhicule physiologiquement acceptable. Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration intratumorale ou par voie orale, parentérale, intranasale, intraartérielle, intraveineuse, intratrachéale etc.

20 Préférentiellement, la composition pharmaceutique contient des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation destinée à être administrée par voie intratumorale.

25 Les compositions selon l'invention peuvent comprendre des doses variables d'adénovirus recombinant, aisément adaptables par l'homme du métier en fonction des applications envisagées et de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé ou encore de la durée de l'expression recherchée. D'une manière générale, les virus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu, et de préférence  $10^6$  à  $10^{11}$  pfu. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux du virus, 30 et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure du nombre

de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

5 En outre, les compositions selon l'invention peuvent également comprendre un agent de transfert chimique ou biochimique. On entend par le terme "agent de transfert chimique ou biochimique" tout composé (i.e., autre qu'un virus recombinant) facilitant la pénétration d'un acide nucléique dans une cellule. Il peut s'agir d'agents non viraux cationiques comme des lipides cationiques, des peptides, des polymères (Polyéthylène Imine, Polylysine), des nanoparticules ; ou d'agents non viraux non cationiques comme des liposomes non cationiques, des polymères ou des nanoparticules non cationiques.

10 Selon un mode préféré, les compositions selon l'invention comprennent un vecteur recombinant défectif comprenant un gène codant pour le transporteur de l'iode NIS et sont formulées pour une administration intratumorale. Avantagusement, les compositions de l'invention comprennent de  $10^4$  et  $10^{15}$  pfu, et de préférence  $10^7$  à  $10^{12}$  pfu.

15 L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un médicament utile pour la prévention, l'amélioration et/ou le traitement des tumeurs caractérisé en ce que l'on mélange un vecteur recombinant comprenant un acide nucléique codant pour un transporteur de l'iode (NIS) avec un ou plusieurs adjuvants compatibles et pharmaceutiquement acceptables.

20 L'invention concerne également une méthode de traitement des tumeurs des mammifères, et notamment de l'homme, comprenant l'administration d'une quantité efficace d'un vecteur adénovirus recombinant défectif comprenant un acide nucléique codant pour le transporteur de l'iode (NIS).

25 Le terme « quantité efficace » désigne une quantité suffisante pour réduire d'au moins environ 15 %, de préférence d'au moins 50 %, et de préférence encore d'au moins 90 % le volume des tumeurs, et plus préférentiellement encore une quantité suffisante pour l'élimination des tumeurs lorsque l'administration de l'adénovirus comprenant un acide nucléique codant pour le transporteur de l'iode (NIS) est associée à un traitement par radiothérapie métabolique à l'iode 135.

L'invention concerne le traitement des tumeurs et plus particulièrement le traitement des tumeurs solides. Parmi les tumeurs solides qui peuvent être traitées par l'objet de l'invention on peut citer notamment les sarcomes et les carcinomes, et à titre d'exemple non limitatif, les fibrosarcomes, les sarcomes ostéogéniques, les angiosarcomes, les endothéliosarcomes, les lymphangiosarcomes, les tumeurs de Ewing, le cancer du colon, le cancer du pancréas, le cancer des ovaires, le cancer de la prostate, les adénocarcinomes, les carcinomes du rein, du foie, du canal biliaire, les tumeur de Wilm's, le cancer du col de l'utérus, le cancer des testicules, le cancer du poulmon, le cancer du poulmon non à petite cellules, le cancer de la vessie, les carcinomes épithéliaux, les gliomes, les astrocytomes, les mélanomes, les neuroblastomes et les rétinoblastomes.

L'invention concerne également la prévention et/ou le traitement des désordres prolifératifs (telles que les métaplasies et les displasies) des tissus épithéliaux tels que l'épithélium du col de l'utérus, de l'oesophage et des poulmons. A cet égard, l'invention concerne le traitement des conditions connues ou suspectées pour précéder une évolution vers une néoplasie ou un cancer, en particulier dans les états où la croissance de cellules non-néoplastiques telle que l'hyperplasie, la métaplasie, et plus particulièrement la displasie se produit (pour une revue de ces conditions anormales de croissance, voir Robbins and Angell, 1976, *Basic Pathology*, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-79). Hyperplasie est une forme de prolifération cellulaire contrôlée impliquant une augmentation du nombre de cellules dans un organe, sans altération structurale ou fonctionnelle significative de cet organe. Par exemple, une hyperplasie de l'endomètre peut précéder le cancer de l'endomètre. La métaplasie est une forme contrôlée de croissance cellulaire dans laquelle un type de cellule adulte ou totalement différenciée se substitue pour un autre type de cellule. La métaplasie peut se produire dans les tissus épithéliaux ou dans les tissus conjonctifs. La displasie est souvent un signe avant-coureur du cancer et se rencontre principalement au niveau de l'épithélium ; c'est la forme la plus fréquente de croissance cellulaire non-néoplastique, impliquant la perte de l'uniformité des cellules individuelles et la perte de l'orientation structurale des cellules. La displasie se produit de manière typique lorsqu'il existe une irritation ou une inflammation chroniques, et est souvent observée au niveau du col de l'utérus, les voies respiratoires, la cavité bucale, et sur la paroi de la vessie. Pour une revue, voir Fishman *et al.*, 1985, *Medicine*, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia.

La présente invention sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui suivent qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

## 5      LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : schéma du plasmide pAB1, du plasmide pXL3048 et du plasmide pAB2. Le plasmide pXL3048 comprend l'extrémité gauche du génome de l'adénovirus de type 5 (nucléotides 1-382), un polylinker comprenant trois sites  
10 uniques de clonage et une partie du gène pIX (nucléotides 3446-4296). Le plasmide pAB2 résulte du clonage du fragment SspI-EcoRV de pAB1 dans pXL3048 préalablement linéarisé par EcoRV.

Figure 2 : obtention du plasmide pXL3215 généré par double recombinaison à partir des plasmides pAB2 et pXL3215 selon la méthode décrite par Crouzet *et al.* (PNAS vol 94 p1414, 1997). Le plasmide pXL3215 contient le génome d'un  
15 adénovirus de type 5 délété pour la région E1 et E3 et contient la cassette d'expression de NIS.

Figure 3 : cinétique d'accumulation de l'iode 125 par les cellules FTRL-5 et SiHa infectées avec le vecteur Ad-NIS (multiplicité d'infection 10). Les résultats de la cinétique sont exprimés en nombre de coups par minute pour  $10^6$  cellules. La  
20 détermination du nombre de cellules par puits au moment du contact avec l'iode est la moyenne de deux mesures.

Figure 4 : inhibition spécifique du transport de l'iode par NIS en présence de perchlorate ( $\text{NaClO}_4$ ) 30, 300 et 3000  $\mu\text{M}$ . Le temps de contact des cellules avec l'iode 125 est de 15 minutes.

25      Figure 5 : accumulation de l'iode *in vivo* par des tumeurs infectées avec le vecteur Ad-NIS. Les cellules MCF-7 (cellules tumorales humaines de cancer mammaire) ont été injectées en sous-cutané chez la souris nude ( $5 \times 10^6$  cellules). Après 15 jours (début d'apparition des tumeurs), des injections intrapéritonéales



quotidiennes de thyroxine ( $2\mu\text{g}/\text{animal}/\text{jour}$ ) ont été effectuées pendant 15 jours. Le vecteur Ad-CMV-NIS a ensuite été injecté à certains animaux en intratumoral ( $2 \times 10^9$  pfu/tumeur ; taille des tumeurs 3-6mm). Trois jours après l'infection,  $6\mu\text{Ci}$  d' $^{125}\text{I}$  sont injectés aux souris en intrapéritonéal. Les comptages sont effectués sur 10 secondes à intervalles de temps réguliers en plaçant la sonde sur la thyroïde, sur la tumeur, et juste à proximité de la tumeur. Les résultats sont exprimés en nombre de coups détectés (mesure sur 10 secondes) en fonction du temps.

Figure 6 : scintigraphie d'une souris dont la tumeur a été infectée par le vecteur Ad-NIS. Les cellules MCF-7 (cellules tumorales humaines, cancer mammaire) ont été injectées en sous-cutané chez la souris nude ( $5 \times 10^6$  cellules). Après 15 jours (début d'apparition des tumeurs), des injections intrapéritonéales quotidiennes de thyroxine ( $2\mu\text{g}/\text{animal}/\text{jour}$ ) ont été effectuées pendant 15 jours. Le vecteur Ad-NIS a ensuite été injecté en intratumoral ( $2 \times 10^9$  pfu/tumeur ; taille des tumeurs 3-6mm). Trois jours post-infection,  $50 \mu\text{Ci}$  d' $^{123}\text{I}$  sont injectés en intrapéritonéal aux souris. Les comptages sont réalisés 1 heure après injection de l'iode. Le cliché est une vue ventrale de l'animal.

## MATERIEL ET METHODES

### Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extractions de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Pour les ligations, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

- 5 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement  
10 ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

- 15 L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant une "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer-Cetus) selon les spécifications du fabricant.

- 20 La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

## EXEMPLES

- 25 **Exemple 1 : construction d'un adénovirus recombinant défectif exprimant le gène codant pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS.**

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur adénoviral défectif portant le gène codant pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS (ref Genbank U60282) lié de manière opérationnelle au promoteur CMV.

Le fragment comportant les nucléotides 74 à 2046 de la séquence du gène *nls* de rat (Dai *et al.*, 1996, Nature 379 : 458-460) a été cloné sous forme d'un fragment AatII-HindIII aux sites PvuII-HindIII du plasmide pCEP-4 (Invitrogen). Le site AatII du fragment AatII-HindIII a préalablement été rendu bout franc par traitement à la  
 5 nucléase Mung Bean (Biolabs) avant insertion dans le plasmide pCEP-4. Le plasmide résultant est nommé pAB1.

Le plasmide pAB1 (figure 1) comprend le gène *nls* dont l'expression est placée sous contrôle de l'enhancer/promoteur du cytomégalo virus CMV (nucléotides -522 à +72) (Boshart *et al.* 1985, Cell, 41 : 521 - 530) et suivi du site de polyadénylation du  
 10 virus SV40 (nucléotides 2538 à 2759 d'après génome de SV40, Genbank locus SV4CG).

L'ensemble formé par (i) l'enhancer/promoteur du cytomégalo virus , (ii) l'ADNc du gène *nls* et (iii), le site de polyadénylation du virus SV40 est appelé ci-après la cassette d'expression de NIS.

15 Le fragment SspI-EcoRV (3711 bp) du plasmide pAB1 comprenant la cassette d'expression de NIS définie ci-dessus est ensuite cloné dans le vecteur navette pXL3048 préalablement linéarisé par EcoRV. Le vecteur résultant est nommé pAB2 (figure 2). Le plasmide pXL3048 est un plasmide dérivé du plasmide Kan-SacB (Crouzet *et al.* PNAS vol 94 p1414-1419, 1997) comprenant l'extrémité gauche du  
 20 génome de l'adénovirus de type 5 (nucléotides 1-382), un polylinker comprenant trois sites uniques de clonage et une partie du gène pIX (nucléotides 3446-4296).

L'adénovirus Ad-NIS a été construit selon la méthode décrite par Crouzet *et al.* (PNAS vol 94 p1414-1419, 1997) par recombinaison homologue entre le plasmide pAB2 et le plasmide pXL3215.

25 Le plasmide pXL3215 contient le génome d'un adénovirus contenant une cassette RSV-LacZ insérée dans sa région E1 ( $\Delta$ E1 386-3446) et une délétion dans la région E3 ( $\Delta$ E3 28592-30470).

Le principe de la construction est décrit dans la figure 2. Le plasmide pXL3215 généré par cette double recombinaison contient le génome d'un adénovirus  
 30 de type 5 délété pour la région E1 et E3 et contenant la cassette d'expression CMV-

NIS-poly A SV40. Cette construction est vérifiée par séquençage de la cassette d'expression de NIS.

L'adénovirus Ad-NIS est généré par infection de l'ADN de pXL3215 digéré par PacI dans la lignée 293 (ATCC CRL-1573). Les particules virales obtenues sont  
5 ensuite amplifiées dans cette même lignée et des stocks de virus produits sont purifiés par double gradient de CsCl.

Les particules virales sont ensuite utilisées pour étudier l'expression du gène NIS dans différentes lignées tumorales.

#### 10 Exemple 2 : accumulation de l'iode *in vitro* par des cellules tumorales infectées avec le vecteur Ad-NIS

La capacité d'accumulation de l'iode dans les cellules infectées avec le vecteur Ad-NIS a été testée dans différentes lignées : des cellules tumorales épithéliales SiHa (ATCC HTB-35), des cellules tumorales mammaires MCF7 (ATCC HTB-22) et T-47D (ATCC HTB-133) et des cellules tumorales d'origine prostatique DU-145 (ATCC  
15 HTB-81) et PC-3 (ATCC CRL-1435).

Les cellules sont infectées avec le vecteur Ad-NIS à une multiplicité d'infection de 10. La capacité des cellules à capter l'iode est testée 28 à 29h après infection selon la méthode de Weiss *et al.* [Endocrinology (1984) 114 :1090-1098]. Les cellules infectées sont lavées avec du tampon HBSS et mises en contact pendant le temps  
20 indiqué dans la figure 3 avec 0,5ml de tampon HBSS contenant 0,1  $\mu$ Ci d'iode 125. A la fin du temps de contact, les cellules sont lavées une fois avec du tampon HBSS froid, puis incubées pendant 20 min avec de l'éthanol froid. La quantité d'iode 125 captée par les cellules est déterminée par dosage de la radioactivité de l'éthanol, avec un compteur gamma.

25 Les résultats obtenus avec la lignée SiHa sont présentés dans la figure 3 et peuvent être comparés à ceux obtenus avec les cellules FRTL-5 (cellules thyroïdiennes de rat, captant l'iode naturellement et servant de contrôle).

L'inhibition spécifique du transport de l'iode par NIS a été testée en présence de perchlorate. Le  $\text{NaClO}_4$  est ajouté dans le tampon HBSS contenant l'iode 125 de

façon à obtenir des concentrations finales de 30, 300 et 3000  $\mu\text{M}$ . Le temps de contact des cellules avec l'iode 125 est de 15 minutes. Les résultats sont présentés dans la figure 4. Les résultats sont exprimés en nombre de coups pour un même nombre de cellules.

5 Les cellules FRTL-5 (contrôle positif) fixent une certaine quantité d'iode, et on observe que ce phénomène est très rapide (maximum presque atteint après 15 min de contact). Les résultats obtenus montrent que les cellules SiHa (cellules épithéliales humaines, tumorales) non infectées ne captent pas d'iode. De manière surprenante, on observe que les cellules SiHa infectées avec le vecteur Ad-NIS captent jusqu'à 5 fois  
10 plus d'iode que les cellules FRTL-5. On remarque également que la cinétique initiale du phénomène est comparable à celle observée pour les cellules FRTL-5. La spécificité du transfert a été confirmée par infection avec un adénovirus contrôle ne comportant pas le gène *nls* (résultat non présenté).

Les résultats des expériences d'inhibition (figure 4) montrent que la fixation  
15 d'iode dans les cellules FRTL-5 est inhibée à plus de 90% à partir d'une concentration en  $\text{NaClO}_4$  de 30  $\mu\text{M}$  (93% pour 30  $\mu\text{M}$ , 95% aux concentrations supérieures). Il est intéressant de noter que, par contre, pour les cellules SiHa infectées par Ad-NIS, la concentration en inhibiteur nécessaire pour obtenir le même taux d'inhibition est beaucoup plus élevée (40% d'inhibition seulement pour 30  $\mu\text{M}$  en  $\text{NaClO}_4$ , 92%  
20 d'inhibition pour 300  $\mu\text{M}$  en  $\text{NaClO}_4$  et 98% pour 3 mM en  $\text{NaClO}_4$ ).

L'expérience d'inhibition permet de conclure que la capacité des cellules SiHa infectées par Ad-NIS à capter l'iode est bien due à l'expression de NIS dans ces cellules, puisque le phénomène est inhibé par  $\text{NaClO}_4$  qui est un inhibiteur compétitif et spécifique du transport des ions iodures par NIS. Des résultats similaires ont été  
25 obtenus pour d'autres lignées cellulaires tumorales humaines (cellules tumorales mammaires : MCF-7 et T47-D, et cellules tumorales d'origine prostatique : DU-145 et PC-3).

Les résultats concernant l'inhibition par  $\text{NaClO}_4$  confirment également que  
30 l'infection de cellules tumorales par Ad-NIS conduit à un niveau d'expression de NIS particulièrement élevé, puisque des concentrations élevées en  $\text{NaClO}_4$  sont requises pour inhiber le phénomène (dans le cas des cellules SiHa, et par rapport aux cellules

FRTL-5, une concentration en inhibiteur 10 fois supérieure est requise pour obtenir un même taux d'inhibition).

L'ensemble de ces résultats démontre que le vecteur adénoviral est un vecteur particulièrement avantageux pour le transfert du gène *nls* et que l'utilisation d'un tel vecteur permet d'atteindre un niveau d'accumulation de l'iode dans des cellules tumorales non thyroïdiennes de l'ordre de 5 fois supérieur à celui observé pour les cellules captant naturellement l'iode 125.

### Exemple 3 : accumulation de l'iode *in vivo* par des tumeurs infectées par le vecteur Ad-NIS

Des cellules MCF-7 (cellules tumorales humaines de cancer mammaire) ont été injectées en sous-cutané chez la souris nude ( $5 \times 10^6$  cellules). Après 15 jours (début d'apparition des tumeurs), des injections intrapéritonéales quotidiennes de thyroxine ( $2 \mu\text{g}/\text{animal}/\text{jour}$ ) ont été effectuées pendant 15 jours, de façon à mettre la thyroïde des animaux au repos. Le vecteur Ad-NIS a ensuite été injecté à certains animaux en intratumoral ( $2 \times 10^9$  pfu/tumeur) ; le diamètre des tumeurs au moment de l'injection était de 3 à 6 mm. Trois jours après l'infection,  $6 \mu\text{Ci}$  d' $^{125}\text{I}$  ont été injectés en intrapéritonéal aux souris, et des comptages sur 10 secondes ont été effectués à l'aide d'une sonde pouvant être déplacée à différents endroits de l'animal. Des comptages ont été effectués à intervalles de temps réguliers en plaçant la sonde sur la thyroïde, sur la tumeur, et juste à proximité de la tumeur. Les résultats sont présentés sur la figure 5. Les résultats sont exprimés en nombre de coups détectés (mesure sur 10 secondes) en fonction du temps.

Dans les animaux contrôles (sans administration de Ad-NIS), la thyroïde fixe une petite quantité d'iode, mais grâce au traitement par la thyroxine, on n'observe pas d'accumulation importante de l'iode dans la thyroïde au cours du temps. On n'observe pas de fixation d'iode dans la tumeur dans les animaux contrôles (voir figure 5A). Le fait que NIS soit naturellement présent dans l'estomac, ainsi que le fait que l'iode soit éliminé par voie urinaire expliquent les valeurs relativement élevées observées (bruit de fond relativement important).

Les animaux traités avec Ad-NIS administré en intratumoral (figure 5B) ne présentent pas d'accumulation importante d'iode au niveau de la thyroïde (effet du traitement par la thyroxine). Sur ces animaux, les quantités d'iode détectées en plaçant la sonde sur la tumeur sont systématiquement plus élevées que les quantité d'iode  
5 détectées à proximité de la tumeur, ce qui indique qu'il y a bien fixation de l'iode dans la tumeur après traitement par le vecteur Ad-NIS.

Afin de confirmer la fixation de l'iode au niveau des tumeurs, des mesures de radioactivité par scintigraphie ont été réalisées sur les animaux traités par le vecteur Ad-NIS. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 6. Les animaux utilisés ont  
10 été préparés selon le protocole décrit ci-dessus, sauf que 50  $\mu\text{Ci}$  d' $^{123}\text{I}$  ont été injectés en intrapéritonéal ; l'image a été obtenue une heure après injection de l'iode.

Le cliché est une vue ventrale de l'animal. Quatre zones de fixation de l'iode sont visibles : la thyroïde, la vessie (voie d'élimination de l'iode), l'estomac (dans lequel NIS est exprimé naturellement), et la tumeur. Ces résultats de scintigraphie  
15 confirment les résultats précédents obtenus par comptage et montrent que les vecteurs selon l'invention permettent d'obtenir une fixation importante de l'iode au niveau des tumeurs.

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence d'ADN codant pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS ou un dérivé de celui-ci.
- 5        2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNc.
3. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNg.
- 10       4. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS murin.
5. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS humain.
- 15       6. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la séquence d'ADN est placée sous le contrôle d'un promoteur transcriptionnel permettant son expression dans les cellules tumorales.
7. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisé, en ce que le promoteur transcriptionnel est choisi parmi les promoteurs viraux, de préférence parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV, MT-1, SV40.
- 20       8. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour le transporteur de l'iode NIS humain sous le contrôle du promoteur CMV.
9. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le transporteur de l'iode NIS ou un dérivé de celui-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les cellules tumorales.
- 25       10. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 9, caractérisé en ce que le promoteur est choisi parmi la séquence de régulation du gène de l'élastase I ,



du gène de l'insuline, des gènes des immunoglobulines, du virus des tumeurs mammaires de souris, du gène PSA, du gène de l'alpha-foetoprotéine, du gène de l'alpha 1-antitrypsine, du gène de la  $\beta$ -globine, du gène de la myéline basique, du gène de la chaîne légère 2 de la myosine et du gène de l'hormone de libération des gonadotrophines.

- 5
11. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.
- 10
12. Adénovirus selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend les ITR et une séquence permettant l'encapsidation; et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels.
13. Adénovirus selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce qu'il ce qu'il comprend au moins une délétion dans la région E1 et une délétion dans la région E3.
- 15
14. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il sagit d'un adénovirus humain de type Ad 2 ou Ad 5 ou canin de type CAV-2.
- 15
15. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 16 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à l'inhibition de la croissance des tumeurs.
- 20
16. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 14.
17. Composition pharmaceutique selon la revendication 16 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.
- 25
18. Composition pharmaceutique selon la revendication 16 ou 17, caractérisée en ce qu'elle comprend entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu/ml, et de préférence  $10^6$  à  $10^{11}$  pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.

ORIGINAL

nucléotidique des gènes de structure codant pour le NIS ou peuvent résulter d'un épissage différentiel ou de modifications post-traductionnelle. Ces dérivés peuvent être obtenus par substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus acides aminés. Ces modifications peuvent être réalisées par toutes techniques  
5 connues de l'homme du métier. Ces dérivés sont notamment des molécules ayant une plus grande affinité pour leurs substrats, des séquences permettant une expression améliorée *in vivo*, des molécules présentant une plus grande résistance aux protéases, des molécules ayant une efficacité biologique plus grande ou des effets secondaires moindres, ou éventuellement de nouvelles propriétés biologiques. D'autres dérivés  
10 utilisables dans le cadre de l'invention sont notamment les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, les dérivés obtenus par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés ou exprimant une activité indésirable, et les dérivés comportant par rapport à la séquence native des résidus supplémentaires, tels que par exemple un signal de sécrétion et/ou  
15 un peptide de jonction.

Le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS ou son dérivé, produit dans le cadre de la présente invention peut être un ADNc, un ADN génomique (ADNg), ou une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de  
20 séquences synthétiques ou semi-synthétiques. De manière avantageuse, on utilise un ADNc ou un ADNg. En particulier, l'utilisation d'un ADNg peut permettre une meilleure expression dans les cellules humaines.

Selon un premier mode de réalisation, il s'agit d'une séquence d'ADNc codant pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS d'origine murine  
25 Selon un mode préféré de l'invention, il s'agit d'une séquence d'ADNc codant pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS d'origine humaine.

Les adénovirus utilisés dans le cadre de la présente invention sont des adénovirus recombinants, c'est à dire comprenant une séquence d'ADN hétérologue. Avantageusement, il s'agit d'adénovirus recombinant défectifs, c'est à dire incapable  
30 de réplication autonome dans les cellules cibles.

Pour la construction des adénovirus selon l'invention, différents sérotypes peuvent être utilisés. Il existe en effet de nombreux sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui présentent une organisation génétique

De manière avantageuse, il peut s'agir d'un gène dont l'expression entraîne une radiosensibilisation des cellules tumorale comme le gène p53.

L'administration de ces gènes ou de la combinaison de deux ou plusieurs de ces gènes d'intérêt thérapeutique précités peut être réalisée par introduction d'un ou  
5 plusieurs de ces gènes dans le vecteur adénoviral comprenant le gène codant pour le transporteur NIS ou dans un vecteur séparé de nature virale ou non virale.

Selon une autre variante, le vecteur selon l'invention peut être administré en combinaison avec un agent anticancéreux tel que notamment, le taxol, le taxotère et autre taxoïdes [tels que décrits notamment dans U.S. 4,857,653 ; US 4,814,470 ; US  
10 4,924,011 ; US 5,290,957 ; US 5,292,921 ; US 5,438,072 ; US 5,587,493 ; EP 0 253 738 ; et WO91/17976 , WO93/00928 , WO93/00929 , et WO9601815], ou d'autres agents thérapeutiques anticancéreux tels que le cis-platine et les dérivés du platine, l'étoposide and etoposide phosphate, bléomycine, mitomycine C, CCNU, doxorubicine, daunorubicine, idarubicine, ifosfamide, etc.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique  
15 comprenant un vecteur adénoviral tel que décrit ci-avant et un véhicule physiologiquement acceptable. Les compositions pharmaceutiques de l'invention sont de préférence sous forme injectable et peuvent être formulées en vue d'une administration intratumorale ou par voie orale, parentérale, intranasale, intraartérielle,  
20 intraveineuse, intratrachéale etc.

Préférentiellement, la composition pharmaceutique contient des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation destinée à être administrée par voie intratumorale.

Les compositions selon l'invention peuvent comprendre des doses variables  
25 d'adénovirus recombinant, aisément adaptables par l'homme du métier en fonction des applications envisagées et de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé ou encore de la durée de l'expression recherchée. D'une manière générale, les virus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu, et de préférence  
30  $10^6$  à  $10^{11}$  pfu. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux du virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure du nombre

### REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence d'ADN codant pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS ou un dérivé de celui-ci.
2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNc.
3. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNg.
4. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS murin.
5. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le transporteur spécifique de l'iode ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporteur) NIS humain.
6. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la séquence d'ADN est placée sous le contrôle d'un promoteur transcriptionnel permettant son expression dans les cellules tumorales.
7. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisé, en ce que le promoteur transcriptionnel est choisi parmi les promoteurs viraux, de préférence parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV, MT-1, SV40.
8. Adénovirus recombinant défectif selon l'une des revendications 5 à 7, comprenant une séquence d'ADNc codant pour le transporteur de l'iode NIS humain sous le contrôle du promoteur CMV.
9. Adénovirus recombinant défectif selon l'une des revendications 5 à 6, comprenant une séquence d'ADN codant pour le transporteur de l'iode NIS ou un dérivé de celui-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les cellules tumorales.
10. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 9, caractérisé en ce que le promoteur est choisi parmi la séquence de régulation du gène de l'élastase I, du gène de l'insuline, des gènes des immunoglobulines, du virus des tumeurs mammaires de souris, du gène PSA, du gène de l'alpha-foetoprotéine, du gène de l'alpha 1-antitrypsine, du gène de la  $\beta$ -

globine, du gène de la myéline basique, du gène de la chaîne légère 2 de la myosine et du gène de l'hormone de libération des gonadotrophines.

11. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.

12. Adénovirus selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend les ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels.

13. Adénovirus selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce qu'il ce qu'il comprend au moins une délétion dans la région E1 et une délétion dans la région E3.

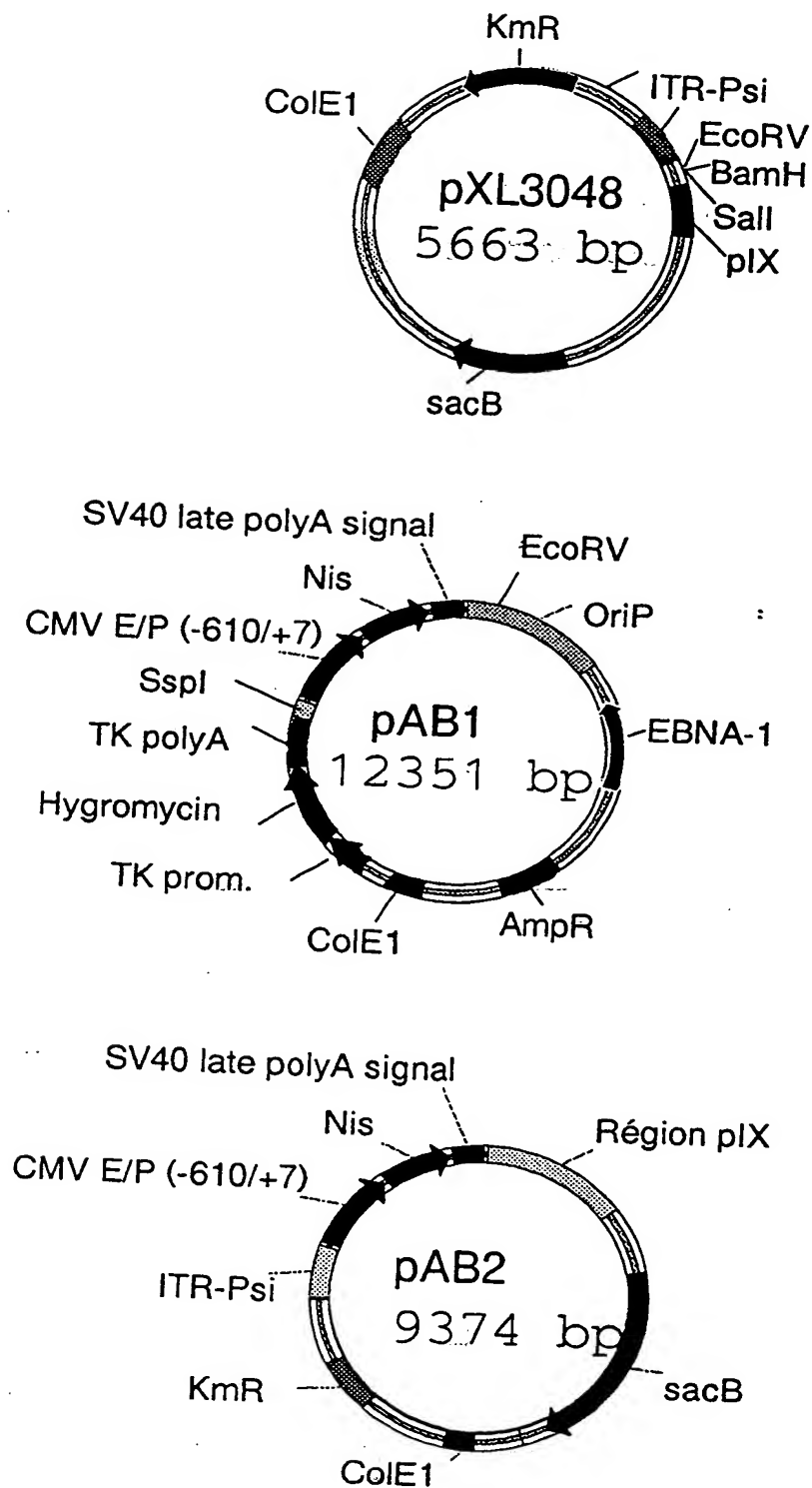
14. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus humain de type Ad 2 ou Ad 5 ou canin de type CAV-2.

15. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 16 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à l'inhibition de la croissance des tumeurs.

16. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 14.

17. Composition pharmaceutique selon la revendication 16 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.

18. Composition pharmaceutique selon la revendication 16 ou 17, caractérisée en ce qu'elle comprend entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu, et de préférence  $10^6$  à  $10^{11}$  pfu adénovirus recombinants défectifs.

FIGURE 1

ORIGINAL

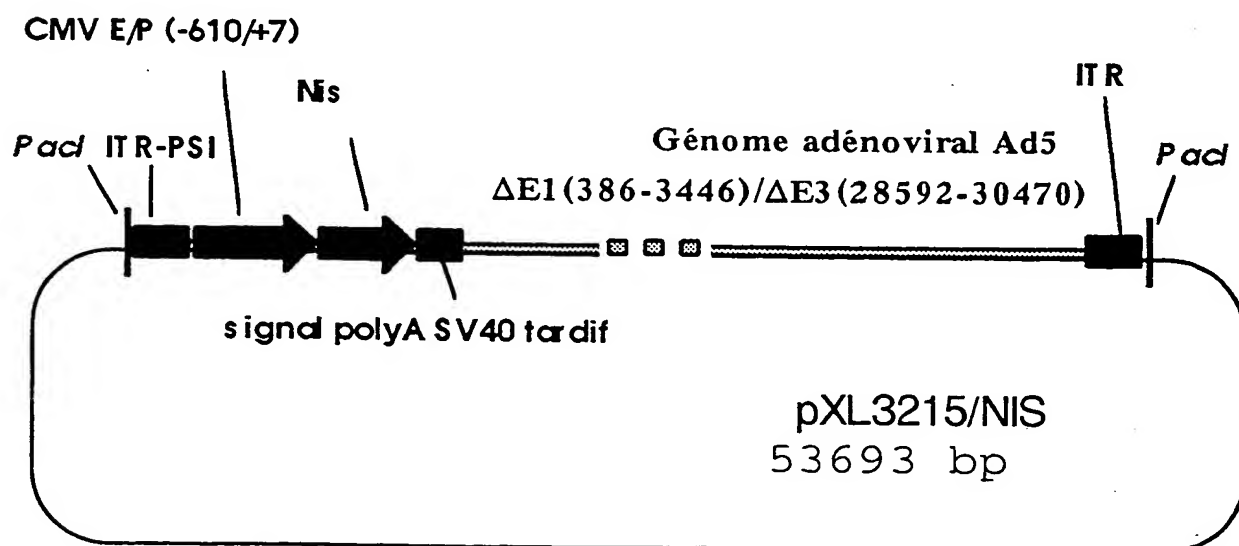
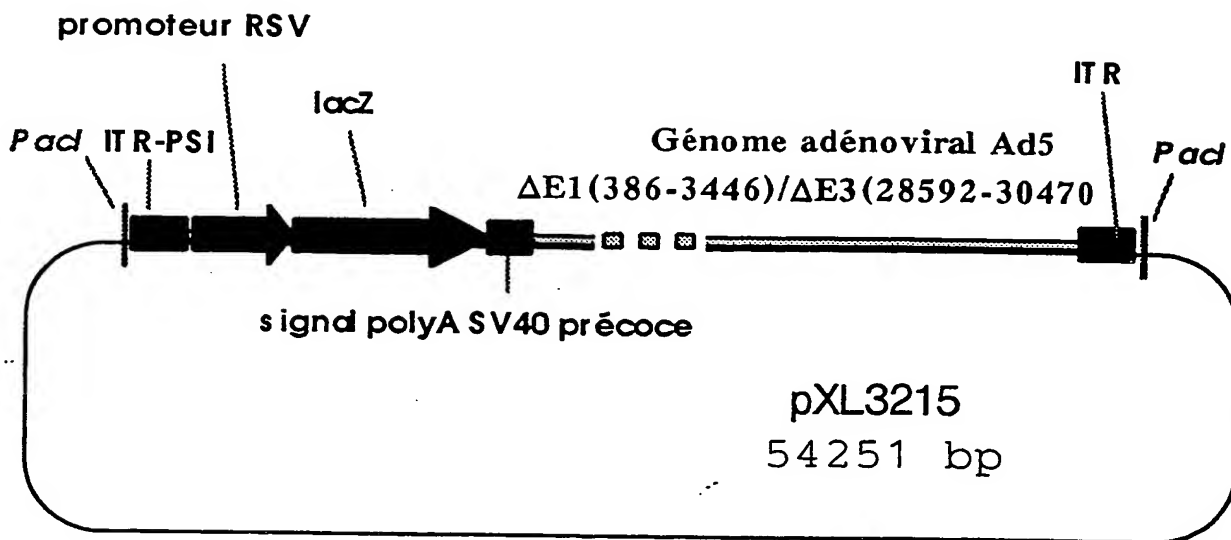
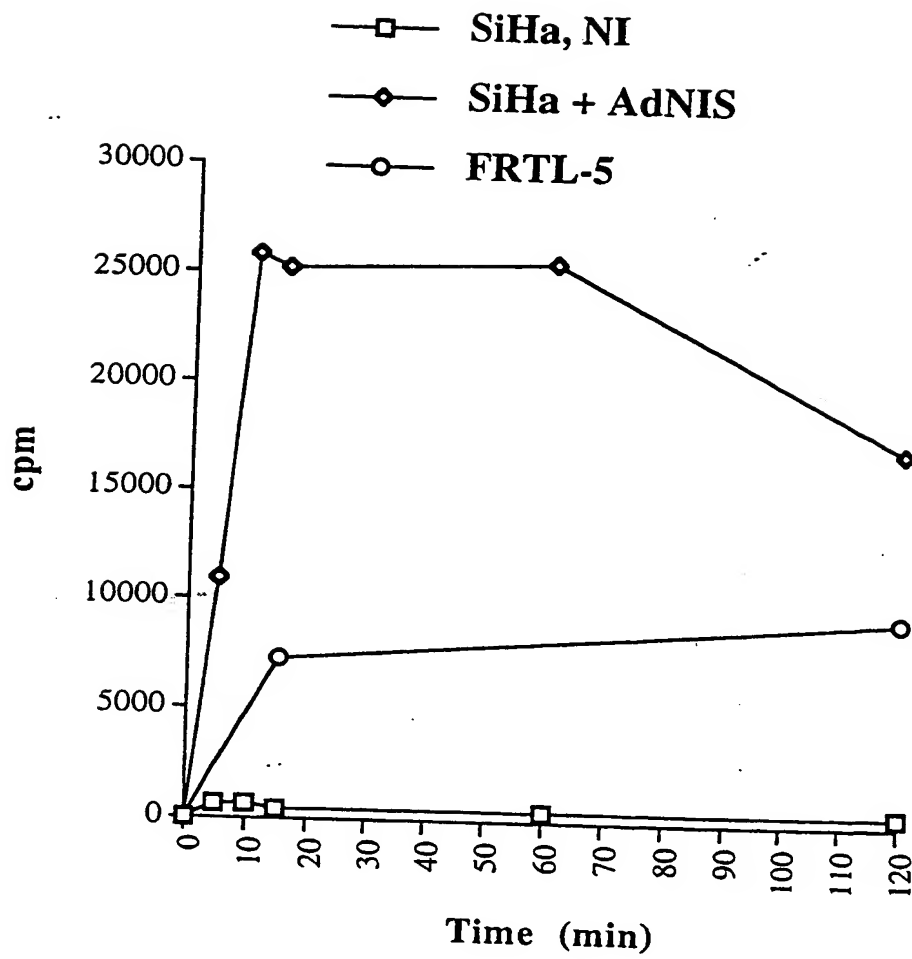


FIGURE 2

ORIGINAL

FIGURE 3

ORIGINAL



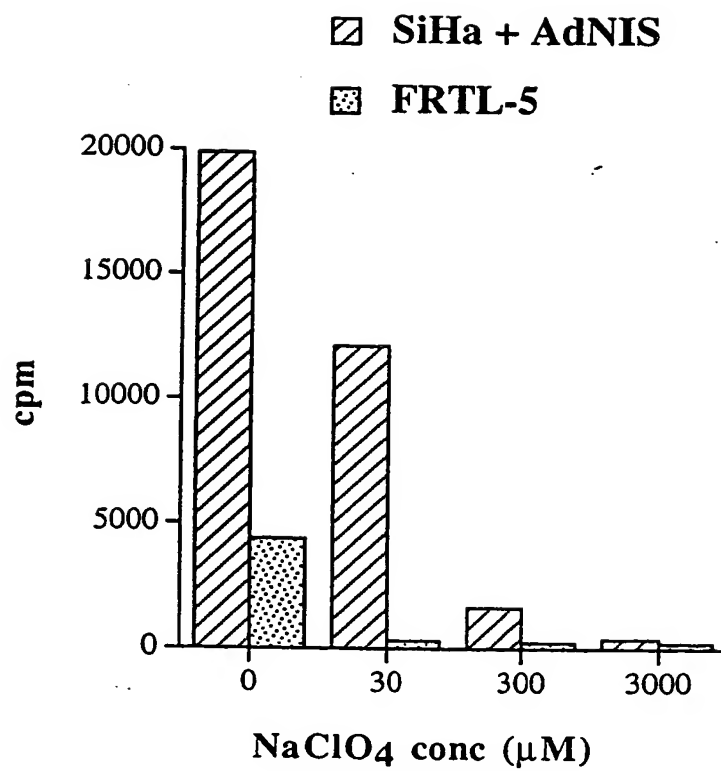


FIGURE 4

ORIGINAL

Souris 1 (tumeur MCF-7, ctl neg.)

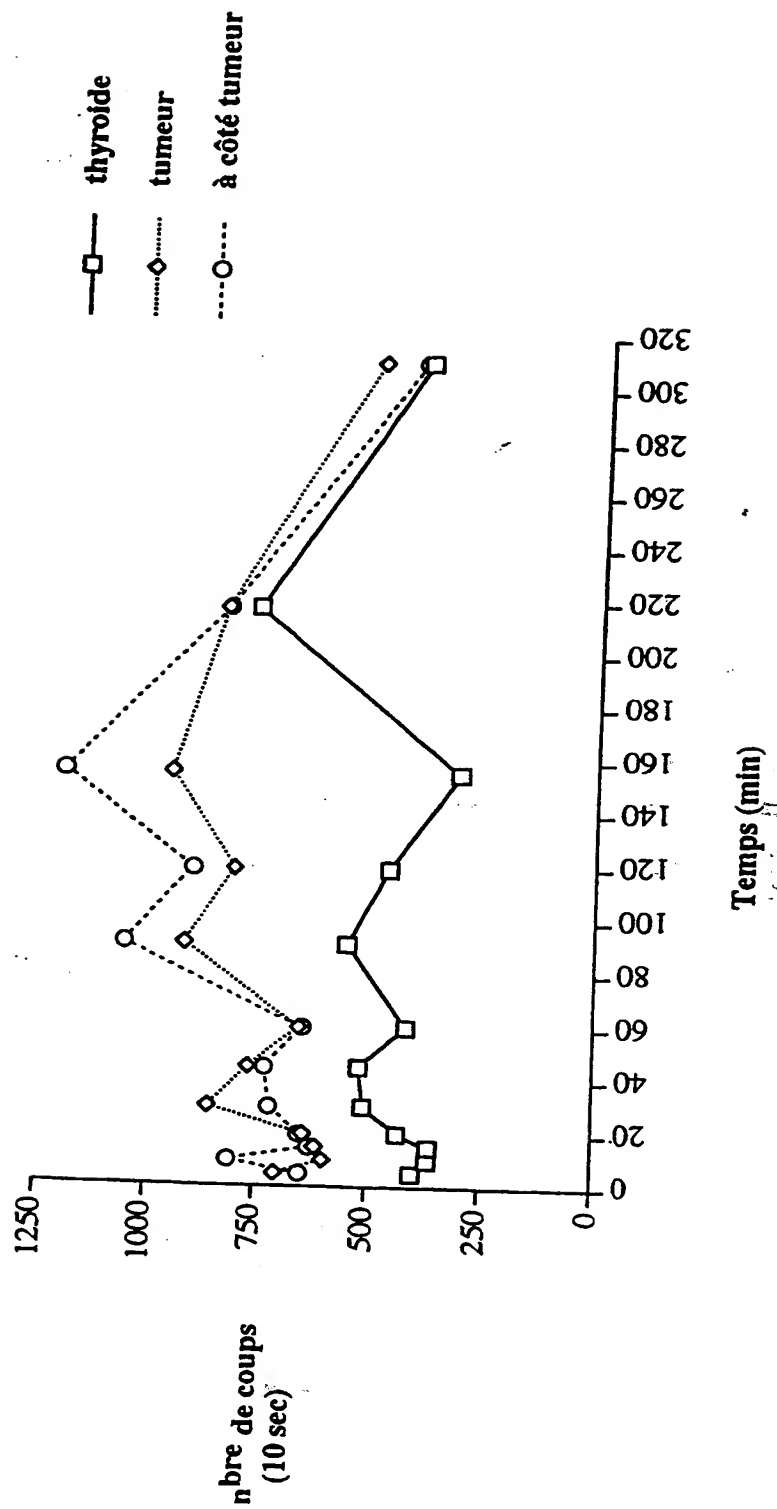


FIGURE 5A

ORIGINAL

## Souris 2 (tumeur MCF-7 + AdNIS)

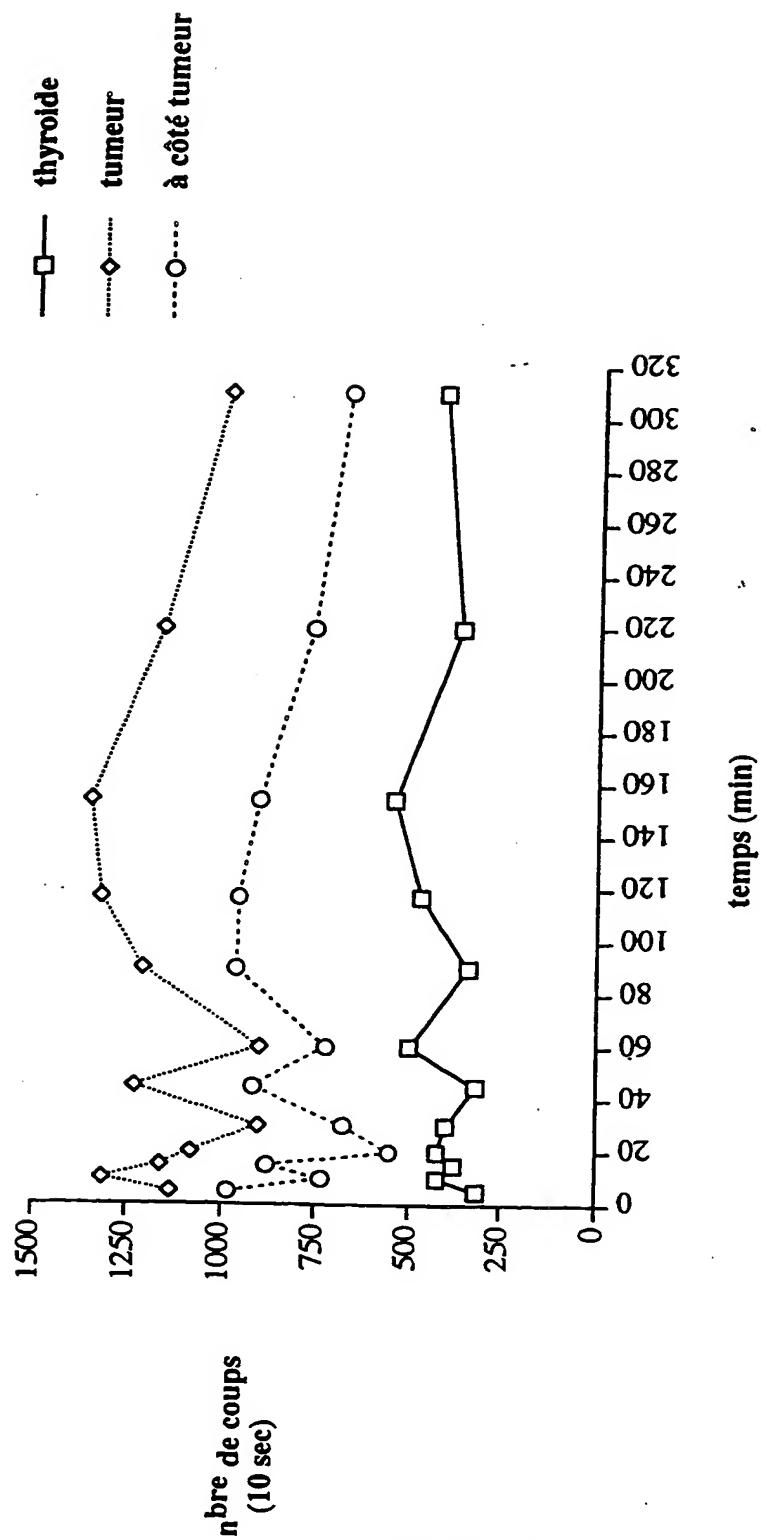


FIGURE 5B

ORIGINAL

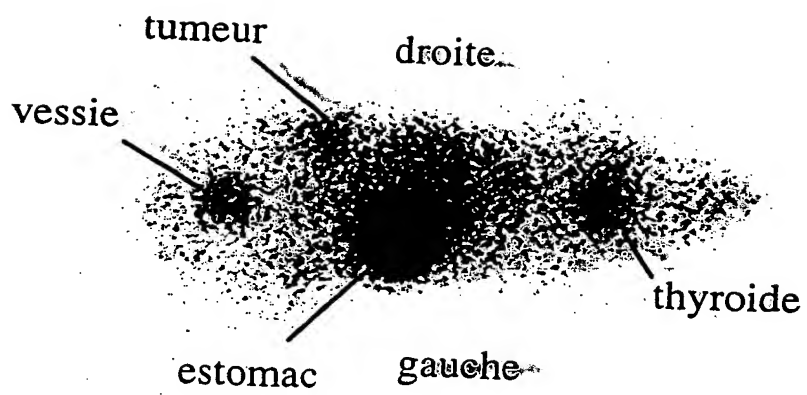


FIGURE 6

BEST AVAILABLE COPY

ORIGINAL